

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

551 263

(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/087915 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09,  
C07K 14/47, A61K 38/17, A61P 37/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004184

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-091819 2003 年 3 月 28 日 (28.03.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市大塚一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP). 興和株式会社 (KOWA COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒4608625 愛知県名古屋市中区錦三丁目 6 番 2 9 号 Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 敏博 (NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 佐々木 巧 (SASAKI, Takumi) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 来海 和彦 (KIMACHI, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 桑田 茂喜 (KUWATA, Shigeki) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 西原 司 (NISHIHARA, Tsukasa) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖

1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 坂田 敦子 (SAKATA, Atsuko) [JP/JP]; 〒8615515 熊本県熊本市四方寄町 1 6 0 4 Kumamoto (JP). 大口 正夫 (OGUCHI, Masao) [JP/JP]; 〒3590041 埼玉県所沢市中新井 3 - 9 - 5 Saitama (JP). 古志 朋之 (KOSHI, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒3530006 埼玉県志木市館 2 - 4 - 4 - 2 0 6 Saitama (JP). 枝野 敏行 (EDANO, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒3500034 埼玉県川越市仙波町 1 - 3 - 1 5 Saitama (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SEB MODIFICATION AND PREVENTIVE/REMEDY FOR DISEASES WITH IMMUNE ABNORMALITY CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称: S E B 改変体およびそれを含有する免疫異常性疾患の予防・治療用剤

(57) Abstract: It is intended to provide a novel preventive/remedy for diseases with immune abnormality which can effectively act as a super-antigen without being neutralized by a neutralizing antibody to Staphylococcus enterotoxin B (SEB) known as a super-antigen. Namely, an SEB modification having a lowered reactivity with a neutralizing antibody to SEB (anti-SEB antibody) and a preventive/remedy for diseases with immune abnormality which contains this modification as the active ingredient. This SEB modification can be obtained via amino acid substitution in the amino acid sequence of SEB, in particular the amino acid sequence at the epitope part recognized by the anti-SEB antibody by using evolutionary molecular engineering techniques.

(57) 要約: スーパー抗原の一つとして知られる黄色ブドウ球菌腸管内毒素 B (S E B) の中和抗体によって中和されることなく、スーパー抗原として有効に作用しうる新規な免疫異常性疾患の予防・治療用剤を提供する。S E B に対する中和抗体 (抗 S E B 抗体) との反応性を低減させた S E B 改変体および該改変体を有効成分として含有する免疫異常性疾患の予防・治療用剤。本願発明の S E B 改変体は、S E B のアミノ酸配列、とりわけ抗 S E B 抗体によって認識されるエピトープ部位のアミノ酸配列でアミノ酸置換を行うことにより、進化分子工学的手法により得ることができる。

WO 2004/087915 A1

## 明 細 書

## S E B 改変体およびそれを含有する免疫異常性疾患の予防・治療用剤

## 技術分野

本願発明は、新規な免疫異常性疾患の予防・治療用剤に関する。更に詳細には、  
5 細菌性スーパー抗原の一つとして知られる黄色ブドウ球菌腸管内毒素 B

(Staphylococcal enterotoxin B ; 以下、「S E B」と呼称する) の改変体お  
よび該改変体を有効成分として含有する関節リウマチ、アレルギー性疾患等の免  
疫異常性疾患の予防・治療用剤に関する。

## 背景技術

10 自己免疫疾患は、関節リウマチ (Rheumatoid arthritis ; 以下、「R A」と  
呼称することがある) 等の臓器非特異的自己免疫疾患と潰瘍性大腸炎等の臓器特  
異的自己免疫疾患とに大きく分けられるが、通常は免疫学的寛容の状態にある自  
己の抗原に対して応答する T 細胞が、何らかの原因で自己の組織内で活性化され  
自己抗原と応答するようになり、これが持続的な炎症反応となって組織に障害を  
15 与えることに起因するものである。その場合の自己抗原とは、それぞれ自己の関  
節の成分である II 型コラーゲンや消化管粘膜の主成分である。

これらの疾患の患者数は毎年、僅かながら増加しているにもかかわらず、今な  
お有効な治療薬や予防方法は見出されていない (山村雄一、岸本忠三、ロバー  
ト・A・グッド編、「薬剤による免疫不全」、免疫科学、1984 年、9 巻、p.  
20 285-289)。現在これらの疾患の治療には、サラゾピリン、5-アミノサ  
リチル酸、アザチオプリン、6-MP、トラニラスト、メトトレキサート、シク  
ロスポリン A、メタロダニゾールの投与および 7 S-免疫グロブリンの大量投与  
等の薬物療法や胸腺摘出術、人工関節への置換術等の外科的療法、更には栄養療  
法等の対症療法が行われている (市川陽一ら、「慢性関節リウマチにおけるメ  
トトレキサートおよびサラゾスルファピリジン長期投与例の検討」、リウマチ、  
25 1995 年、35 巻、p. 663-670 ; 柏崎禎夫、「慢性関節リウマチに対す  
るオーラノフィンとメトトレキサートによる併用療法の検討」、リウマチ、19  
96 年、36 巻、p. 528-544 ; 古谷武文ら、「慢性関節リウマチにおけ  
る低用量メトトレキサート療法の有害事象」、リウマチ、1996 年、36 巻、

p. 746-752; 渡辺言夫、「若年性関節リウマチの薬物療法」、リウマチ、1996年、36巻、p. 670-675; 八倉隆保、「免疫抑制療法・自己免疫疾患の治療」、総合臨床、1981年、30巻、p. 3358; および都外川新ら、「慢性関節リウマチにおけるメトトレキサート療法の検討—有効性のより高い投与法を求めて—」、リウマチ、1997年、37巻、p. 681-687)。しかしながら、これらは根治的な療法とはいえず、むしろ長期服用によるため重篤な副作用の原因ともなり、より有効な予防・治療薬、治療法の開発が望まれている。

SEBは黄色ブドウ球菌によって産生されるエンテロトキシン（腸管毒；毒素型食中毒の原因毒素）の1種である。SEBは239個のアミノ酸残基よりなり、そのアミノ酸配列も知られている。SEB分子は2つのドメインから構成され、最初のドメインは残基1～120よりなり、2番目のドメインは残基127～239よりなる。また、SEBのN末端部分にはクラスII主要組織適合遺伝子複合体（Major Histocompatibility Complex；以下、「MHC」と呼称する）分子結合および／またはT細胞抗原受容体（T cell antigen receptor；以下、「TCR」と呼称する）結合に影響を与える3つの領域（領域1（残基9～23）、領域2（残基41～53）および領域3（残基60～61））が同定されている。

SEBは周知のように細菌性スーパー抗原の1種である（ホワイト（White J.）ら、Cell, 1989, vol. 56, p. 27-35）。通常の抗原はMHCと複合体を形成した状態でT細胞上のTCRに認識され、しかもその認識はクラスII MHC分子のハプロタイプに限定される（これを「MHC拘束性」という）。これに対してスーパー抗原は、クラスII MHC分子のハプロタイプに非拘束性に結合し、さらに特定のTCRのβ鎖領域（Vβ鎖）に結合する。その結果、スーパー抗原が結合したT細胞は一時的に活性化され分裂増殖を引き起こし、炎症性のサイトカインを産生する（ミクサン（Micusan V. V.）およびチボディーン（Thibodean J.）, Seminars in Immunology, 1993, vol. 5, p. 3-11）。

スーパー抗原を新生マウスに静脈内あるいは腹腔内投与すると、これに応答するVβ TCRをもったT細胞亜集団が除去され、同じスーパー抗原に対して応答

しなくなるトレランスの状態になる。一方、成体のマウスに投与した場合、そのスーパー抗原に結合するV $\beta$ TCRを持つT細胞がスーパー抗原の再刺激に対して応答しなくなる状態、すなわち、アナジーが誘導されトレランスの状態になる。このようなスーパー抗原の特徴は通常の抗原認識とは異なっている。特定のV $\beta$ TCRを持つT細胞にトレランスを誘導するという性質は、ある種の免疫異常性疾患、特にI型アレルギー性疾患や自己免疫疾患の予防もしくは治療に応用できる可能性を示唆している。事実、疾患モデルマウスの系を用いてSEBを投与することで発症抑制が可能となったという報告がなされている。

キム (Kim C.) らは全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus ; 以下、「SLE」と称する) のモデルマウスであるMR L/1 p r マウスのループス腎炎が、SEBをあらかじめ投与しておくことにより発症を抑制できることを報告した (キム (Kim C.) ら、Journal of Experimental Medicine, 1991, vol. 174, p.1131)。またロット (Rott O.) らは実験的アレルギー性脳脊髄膜炎 (Experimental Allergic Encepharomyelitis ; 以下、「EAE」と称する) の系で前もってSEBを投与し、SEB応答性のV $\beta$ 8TCRを持つT細胞をトレランス状態にしておくことで発症が抑制できたことを報告した (ロット (Rott O.) ら、International and National Immunology, 1991, vol. 4, p.347)。これらの結果は、SEBをワクチンのように用いることで特定の自己免疫疾患の発症を予防できる可能性を示唆するものである。

しかしながらこれらの実験ではSEBの投与方法は静脈内もしくは腹腔内であり、投与量も1匹当たり100 $\mu$ g前後とかなり多い。このような投与量ではマウスに対して無視できない程度の病原性をもたらすことは必至であり、また抗原性や免疫原性も問題となる。特にスーパー抗原の大量投与は、前述のごとくT細胞亜集団や抗原提示細胞の一時的な活性化を引き起こし、炎症性サイトカインの産生亢進を招き、体内に急激な炎症状態を惹起するという問題がある。また桑畑らはヒトの場合、就学年齢以上の児童では血中にほぼ100%抗SEB抗体を保有し、更に、唾液等での解析から約50%に抗IgA抗体が検出されることを報告している (桑畑 (M. Kuwahata) ら、Acta Pediatrica Japonica, 1996, 38, p.1-7)。また折口らはリウマチ患者血清中のIgM型抗SEB抗体が有意に高

値を示すことを明らかにしている（折口（Origuchi）ら、Annals of the Rheumatic Disease 1995, 54, p. 713-720）。更に西らは、ヒト血清中の抗SEB抗体の主要エピトープがC端側に存在し、この領域に対する抗体はSEBの中和抗体であることを明らかにしている（西（Jun-Ichiro Nishi）ら、The journal of Immunology, 1997, 158, p. 247-254）。このことはSEBをヒトに投与した場合、抗体によってSEBの生物活性が中和され、体内から排除されることを意味する。そこで西らは遺伝子工学的手法を用いてC端の主要エピトープを欠如した欠損変異体を構築した。しかしながら、このようにして調製したSEB改変体は不溶性にしか発現せず、十分な評価・解析ができなかった。また、薬剤としての安定供給にも対応できなかった。

本発明者らは、スーパー抗原の大量投与に関連する問題について、高度に精製したSEBを病原性を与えない投与量で連続的に長期間経口投与することにより、有効にトレランスを誘導する方策（特開平9-110704）、ならびにSEBの分子改変を行って本来のSEBの有する毒性を軽減しつつも、免疫異常性疾患の予防・治療に効果を発揮するSEB改変体およびそれらの誘導体を構築し、その有用性を証明してきた（WO99/40935）。

#### 発明の開示

（発明が解決しようとする技術的課題）

上記のようにSEBを天然のままでヒトに投与した場合、生体に存在する抗SEB抗体によってSEBの生物活性が中和され、最終的には体内から排除されてSEBによる所望の効果を期待できないという問題がある。そのため、遺伝子工学的手法を用いてSEBのC端の主要エピトープを欠如した欠損変異体も構築されているが、このようにして調製したSEB改変体は不溶性にしか発現せず、それゆえ十分な評価・解析ができておらず、薬剤としての安定供給にも対応できなかった。

（その解決方法）

本発明者は、上記のSEBの抗原性に関連する問題を回避するため、進化分子工学的手法（試験管内生物進化）を用いて鋭意研究したところ、天然型のSEBあるいは既知のSEB改変体にアミノ酸置換を導入し、これら改変体の中からス

クリーニングすることによって、抗SEB中和抗体との結合性が減弱し、かつ大腸菌で可溶性に発現可能で水溶液中における安定性を保持し、さらに天然のSEBと同等の免疫異常性疾患の改善作用を保持したSEB改変体を調製することができた。

- 5       本願発明は、黄色ブドウ球菌腸管内毒素B（SEB）に対する中和抗体（抗SEB抗体）との反応性を低減させたSEB改変体を提供する。

（従来技術より有効な効果）

- 10       本願発明のSEBエピトープ改変体は、SEBに対する中和抗体との反応性が低減し、且つN23Y〔SEBの23位のアスパラギン残基をチロシン残基に置き換えた変異体；WO99/40935（PCT/JP99/00638）〕と同等のCIA（コラーゲン誘導性関節炎）症状改善効果があることが示された。更にこれらのエピトープ改変体は可溶性に分泌発現が可能であり、関節リウマチ、アレルギー性疾患等の免疫異常疾患の有効な予防・治療用剤としての使用が期待される。

15       **図面の簡単な説明**

図1は、抗SEB中和モノクローナル抗体SA58-2を用いて、SEBによるヒトPBMC（末梢血単核球）活性化の抑制試験の結果を示す。

図2は、本願発明のSEBエピトープ改変体の、抗SEB中和モノクローナル抗体SA58-2（A）、あるいはヒト抗SEB抗体（B）との反応性を示す。

- 20       図3は、本願発明のSEBエピトープ改変体でヒトPBMCを3日間刺激して、細胞の増殖応答をトリチウムチミジンのカウントで測定した結果を示す。

図4は、本願発明のSEBエピトープ改変体でヒトPBMCを6日間刺激して、細胞の幼若化反応をフローサイトメトリーで測定後、幼若化の割合をパーセントで示す。

- 25       図5は、本願発明のSEBエピトープ改変体でヒトPBMCを2日間刺激し、培養上清中に分泌される各種サイトカインをELISA法で測定して得られた結果（B）、および該測定値を野生型SEBに対する相対値で表したもの（A）を示す。

図6は、本願発明のSEBエピトープ改変体についてマウスのコラーゲン誘導

性関節炎（C I A）モデルで四肢の腫脹の抑制を評価した結果を示す。

図 7 は、本願発明の S E B エピトープ改変体についてマウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルで骨破壊の抑制を評価した結果を示す。

5 図 8 は、本願発明の S E B エピトープ改変体を経口投与したマウスの血中の抗 S E B 抗体価（A）および抗 4 7 - C 7 抗体価（B）の測定値（4 5 0 n m の吸光度の値）を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

10 本願発明の S E B 改変体は、S E B のアミノ酸配列に任意のアミノ酸置換を導入することにより抗 S E B 抗体との反応性を低減させたものである。かかるアミノ酸置換の導入は、とりわけ S E B のアミノ酸配列中の抗 S E B 抗体エピトープ認識部位で行うのが好ましい。

S E B のアミノ酸配列中のアミノ酸置換部位として本願発明において特に好ましいのは、S E B のアミノ酸配列（配列番号 1）中の 2 2 6 位の L y s から 2 2 9 位の L y s までの領域である。

15 本願発明に従って抗 S E B 抗体との反応性を低減させた S E B 改変体の具体例としては、S E B のアミノ酸配列中の 2 2 6 位から 2 2 9 位までのアミノ酸配列が以下のものが挙げられる：

- (1) L e u P h e A l a A l a （配列番号 2）；
- (2) A l a T h r T h r G l n （配列番号 3）；
- 20 (3) L y s A r g I l e I l e （配列番号 4）。

本願発明による S E B 改変体はまた、上記アミノ酸置換とともに S E B のアミノ酸配列中の 2 3 位の A s n が T y r で置換されているものをも包含する。

25 本願発明はさらに、本願発明に従って得られる S E B 改変体を主成分として含有し、S E B に対する免疫学的応答性を低下させ、T 細胞活性化の抑制作用を有するものであることを特徴とする、免疫異常性疾患の予防・治療用剤をも提供する。免疫異常性疾患としては、たとえば、関節リウマチ、アレルギー性疾患、およびこれらに類似の疾患が挙げられる。

本願発明による S E B 改変体を調製するに際して採用した「進化分子工学的手法」とは、自然界における生物進化（自然淘汰）の過程（あるタンパク質中の 1

つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換される確率は、およそ1回/1000万年であるといわれている)を試験管内で人為的に急加速させて有用なタンパク質等をデザインしようとするものであり、自然界では何万年とかかる進化(新機能獲得、機能向上等)を数ヶ月で行わせることが可能である。

- 5 本願発明では、抗SEB中和抗体との結合性の低減したSEB改変体を調製するため、抗SEB中和抗体によって認識されるSEB中のエピトープ部位においてアミノ酸置換をランダムに導入し、得られた改変体の中から抗SEB中和抗体との結合性の低減した改変体をスクリーニングした。上記のように、SEBの主要エピトープはC末端(225~234位)に存在することがわかっているの、
- 10 本願発明ではこのうち226~229位の4アミノ酸残基でのアミノ酸置換を試みた。すなわち、SEBのアミノ酸配列中の226~229位の4アミノ酸残基を天然の20種のアミノ酸で任意に置換した改変体を作製して試験管内で淘汰をさせる母集団とし、その中から抗SEB中和抗体との結合性の低減したSEB改変体をスクリーニングし、さらに大腸菌で可溶性に発現可能で水溶液中における
- 15 安定性を保持していること、および天然のSEBと同等の免疫異常性疾患の改善作用を保持していることも確認した。

具体的には、本願発明のSEB改変体の構築はファージディスプレイライブラリー法を用いて以下のようにして行った。

- (1) 野生型SEBのファージディスプレイライブラリーの構築とSEBの抗原性
- 20 性の確認

- まず、野生型SEBを提示したM13ファージを構築する。発現ベクター、たとえばpTrc99A(Amersham-Pharmacia社)に組み込まれた野生型SEB発現プラスミドを鋳型として、5'-プライマーにはSfiI認識配列を3'-プライマーにはNotI認識配列を付加したプライマーを用いてPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)で増幅する。増幅産物を制限酵素SfiI-NotIで消化し、
- 25 プラスミドに組み込み、大腸菌を該プラスミドで形質転換後、ヘルパーファージを感染させ、野生型SEBをファージg3蛋白との融合蛋白(SEB-g3融合蛋白)として提示したファージ粒子を発現させる。発現の確認は抗SEBウサギポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットで確認することができる。



次にSEBを提示するファージを段階希釈して抗SEB中和モノクローナル抗体、ヒト血漿由来抗SEB抗体、および抗Etag抗体との反応性をELISA法で測定し、SEBがファージ上で抗原性を保持して提示されているかを調べればよい。

5 (2) ランダム変異ファージディスプレイライブラリーの構築

SEBまたは既知のSEB改変体のC端の226～231位にランダムな変異を導入したランダム変異ファージディスプレイライブラリーを構築する。SEBまたは既知のSEB改変体を発現ベクターに組み込んだプラスミドを鋳型としてPCR法により226～231位にランダムな変異を導入する。既知のSEB改変体としては、たとえば、SEBの23位のアスパラギン残基をチロシン残基に置き換えた変異体であるN23Y [WO99/40935 (PCT/JP99/00638)] を用いることができる。

変異導入は、たとえば以下のようにして行う。5'-プライマーにはSfiI認識配列（完全長のSEBのN末端に相当する領域に対応）を付加し、3'-プライマーにはNotI認識配列を付加するとともに、226～229位に相当する領域の各アミノ酸に対応したコドンにNNK（NはA、C、G、Tのいずれか、KはGまたはTの塩基を表す）を4回繰り返して組み込んだプライマーを用いて226～229位に20種のアミノ酸が任意に発現するようにしたSEBランダム遺伝子を作製する。SEBランダム遺伝子をSfiI/NotIで処理後、プラスミドに組み込み、大腸菌を該プラスミドで形質転換して変異体のライブラリーを構築する。

この形質転換体ライブラリーにヘルパーファージを感染させ、SEBランダムをファージg3蛋白との融合蛋白として提示したファージ粒子を発現させる。

(3) SEB中和抗体低反応性SEB改変体のスクリーニング

25 抗SEB中和モノクローナル抗体に対する反応性、およびEtag発現効率を指標にして、上記ライブラリーを用いてスクリーニングする。抗SEB中和モノクローナル抗体としては、中和活性を有することが確認されているものとして、たとえばSA58-2（化学及血清療法研究所により作製）を用いることができる。具体的には、第一ステップとして、抗Etag抗体を固相化したプレートに

ランダム変異ファージディスプレイライブラリーを反応させて、SEB改変体融合蛋白（g3-Etag-SEB改変体）を可溶性に発現しているファージを選択する。第二ステップとして、抗SEB中和モノクローナル抗体を固相化したプレートに対して、第一ステップで選択したファージを反応させ、抗体と反応できないファージを回収する。得られたクローンを分離し、変異を導入したエピトープ部位の配列解析、g3融合蛋白の発現、発現部所、ヒト抗SEB抗体との反応性を解析する。

#### （４）抗SEB中和抗体低反応性SEB改変体の選択・評価

上記（３）で得られたクローンをさらに可溶性発現、発現量、抗SEB抗体との反応性を指標に解析を続け、幾つかのクローンまで絞り込みを行い、これらのクローンについて、抗SEBモノクローナル抗体、アフィニティー精製ヒト抗SEB抗体との反応性をサンドイッチELISAで評価する。

最後に、反応性の低下したクローンについて改変したエピトープ部位のアミノ酸配列の決定を行う。

以下に、実施例に従って本願発明を詳説するが、本願発明はこれら実施例に何等限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### 抗SEB抗体を用いたSEBによるT細胞活性化の抑制

SEBに対して特異性を有する中和モノクローナル抗体SA58-2（化学及血清療法研究所により作製）、および日本脳炎ウイルスに対して特異性を有するJF2抗体（化学及血清療法研究所により作製）を用いて、SA58-2抗体のSEB中和能の評価を行った。

健康人の末梢血単核球を $1 \times 10^5$ /ウェルとなるように96ウェルプレートに播種し、SEB（トキシンテクノロジー社製）を $1 \text{ ng/mL}$ の濃度で添加し、同時にSA58-2抗体およびJF2抗体を $0.05$ 、 $0.5$ 、 $5$ 、 $50 \text{ ng/mL}$ 加えて3日間刺激し、ハーベスト16時間前にトリチウムチミジン（ $0.5 \mu\text{Ci}$ ）を取り込ませて増殖誘導活性を調べた。

その結果、SEBによる増殖刺激活性はJF2抗体を $50 \text{ ng/mL}$ 添加しても抑制は認められなかったが、SA58-2抗体を添加した系では、 $5 \text{ ng/mL}$

L以上添加した場合、80%以上の抑制効果が認められた（図1）。従って、SA58-2抗体はSEBのリンパ球活性化能を十分に抑制できる中和抗体であることが確認できた。

## 実施例2

### 5 SEB改変体の抗SEB抗体との反応性

(1) 野生型SEBのファージディスプレイライブラリーの構築とSEBの抗原性の確認

10 進化分子工学的アプローチを用いて抗SEB抗体との結合性を減弱させたSEB改変体の構築は以下のように進めた。まず、野生型SEBを提示したM13ファージを構築した。発現ベクターpTrc99A（Amersham-Pharmacia社）に組み込まれた野生型SEB発現プラスミド（pTrc99A/SEB）を鋳型として、5'-プライマーにはSfiI認識配列を3'-プライマーにはNotI認識配列を付加したプライマーを用いてPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）で増幅した。増幅産物を制限酵素SfiI-NotIで消化し、pCANTAB5E  
15 （Pharmacia社）に組み込んだ。このプラスミドを「pCAN/SEB」と命名した。大腸菌TG1をpCAN/SEBで形質転換後、ヘルパーファージを感染させ、野生型SEBをファージg3蛋白との融合蛋白（SEB-g3融合蛋白）として提示したファージ粒子を発現させた。発現の確認は抗SEBウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットで確認した。

20 次にSEBを提示するファージを段階希釈して抗SEB中和モノクローナル抗体SA58-2（化学及血清療法研究所により作製）、ヒト血漿由来抗SEB抗体、抗Eta g抗体（Amersham-Pharmacia社）との反応性をELISA法で測定し、SEBがファージ上で抗原性を保持して提示されているか調べた。SEB発現ファージを $1 \times 10^{10}$ から10倍段階希釈して96ウェルプレートに添加し、  
25 抗SEB抗体、あるいは抗Eta g抗体と反応させ、HRP標識二次抗体で発色させて吸光度を測定した。その結果、SEBはファージ上で天然な状態と同様の抗原性を保持して発現、提示されていることが確認された。

(2) ランダム変異ファージディスプレイライブラリーの構築

SEB改変体の一つであるN23Y [SEBの23位のアスパラギン残基をチ

ロシン残基に置き換えた変異体：WO99/40935（PCT/JP99/00638）]をpTrc99Aに組み込んだプラスミドpTrc99A/N23Yを鋳型にして、PCR法にてC端の226～229位にランダムな変異を導入した。変異導入は以下のように行った。

5        5'プライマーにはSfiI認識配列（完全長のSEBのN末端に相当する領域に対応）を付加し、3'プライマーにはNotI認識配列を付加するとともに、226～229位に相当する領域の各アミノ酸に対応したコドンにNNK（NはA、C、GまたはTのいずれか、KはGまたはTの塩基を表す）を4回繰り返して組み込んだプライマーを用いて226～229位に20種のアミノ酸が  
10        任意に発現するようにしたN23Yランダム遺伝子を作製した。N23Yランダム遺伝子をSfiI/NotIで処理後、pCANTAB5Eに組み込んだ。このプラスミドを「pCAN/N23Yランダム」と命名した。大腸菌TG1をpCAN/N23Yランダムで形質転換した結果、 $1.88 \times 10^5$ 種の変異体からなるライブラリーを構築できた。

15        この形質転換体ライブラリーにヘルパーファージを感染させ、N23Yランダムをファージg3蛋白との融合蛋白として提示したファージ粒子を発現させた。Et ag抗体およびSA58-2抗体、アフィニティー精製ヒト抗SEB抗体との反応をELISAで解析した結果、N23Yランダムのファージ上への呈示率は野生型の1/20にすぎないが、SA58-2抗体、アフィニティー精製ヒト  
20        抗SEB抗体との反応性は1/200以下に低下していることを確認した。従って、ライブラリーを構成するN23ランダムの各抗体への反応性は野生型に比べ平均約1/10に低下していると考えられた。このことはこのライブラリー中にこれらのSEB抗体との反応性が低下した配列が十分に含まれていることを示していると考えられた。

### 25        (3) SEB中和抗体低反応性SEB改変体のスクリーニング

中和活性を有することが確認されている抗SEB中和モノクローナル抗体SA58-2に対する反応性、およびEt ag発現効率を指標にして、上述のライブラリーを用いてスクリーニングを3回実施した。すなわち、第一ステップとして、抗Et ag抗体を固相化したプレートにランダム変異ファージディスプレイライ

ブラリーを反応させて、SEB改変体融合蛋白（g3-Etag-SEB改変体）を可溶性に発現しているファージを選択した。第二ステップとして、抗SEB中和モノクローナル抗体SA58-2を固相化したプレートに対して、第一ステップで選択したファージを反応させ、抗体と反応できないファージを回収した。

5 この中から任意に48クローンを分離し、変異を導入したエピトープ部位の配列解析、g3融合蛋白の発現、発現部所、ヒト抗SEB抗体との反応性を解析した。

その結果、48クローン中30クローンがg3との融合蛋白として発現しており、その中で21クローンが培養上清中に発現可能であった。更に21クローン中10クローンはヒト抗SEB抗体と明らかに反応したが、残る11クローンの反応性は顕著に低下していた。

10

#### （4）抗SEB中和抗体低反応性SEB改変体の選択・評価

可溶性発現、発現量、抗SEB抗体との反応性を指標に更に解析を続けた結果、4-C1、4-C3、42-C2、42-C3、47-C3、47-C7、48-C1、48-C4の8クローンに絞り込まれた。これらのクローンについて、SA58-2抗体、アフィニティー精製ヒト抗SEB抗体との反応性をサンドイッチELISAで評価した。

15

発現蛋白量を併せて、両抗体に対する反応性を評価した結果、全てのクローンで反応性が低下していた（図2）。特に中和抗体であるSA58-2に対する反応性は、鋳型に用いたN23Yと比べてクローン42-C2や48-C1、48-C4で約1/30～1/50、47-C7で約1/8、4-C1で約1/2に低下していた（表1）。精製ヒト抗SEB抗体に対する反応性では、同じく42-C2や48-C1、48-C4、また47-C7で約1/8程度、4-C1で約1/2～1/4に低下していた（表1）。なお、これら抗SEB抗体との反応性を調べたクローンについては、エピトープ領域中のアミノ酸置換部位の配列も決定し、表1に示した。

20

25

以上の反応性を総合的に解析評価して、以下の実験には42-C2、47-C7、および4-C1を用いることとした。N23Yを鋳型としたこれらのSEB改変体を、以下、「エピトープ改変体」と総称する。

表1：エピトープ改変体の抗SEB抗体との反応性低下

クローンNo.	エピトープ領域配列	抗SEBモノクローナル抗体との反応性	ヒト抗SEB抗体との反応性
N23Y	SKDVKIEVYL (配列番号5)	1	1
42-C2	SLFAAIEVYL (配列番号6)	1/50	1/8
47-C7	SATTQIEVYL (配列番号7)	1/8	1/8
4-C1	SKRIIEVYL (配列番号8)	1/2	1/2~1/4
48-C4	SPQPDIEVYL (配列番号9)	1/30	1/8

実施例3エピトープ改変体の末梢血単核球に対する生物学的解析

## (1) エピトープ改変体の増殖ならびに幼若化誘導活性の評価

- 5 健康人の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell ; 以下、「PBMC」と称することがある) を  $1 \times 10^5$  / ウエルとなるように96ウェルプレートに播種し、SEB、N23Y、SEBエピトープ改変体を0.01、1、100、1000 ng/mLの濃度で3日間刺激し、ハーベスト16時間前にトリチウムチミジン ( $0.5 \mu\text{Ci}$ ) を取り込ませて増殖誘導活性を調べた。また、
- 10 上記PBMCを各々同濃度のSEB改変体存在下で中期間 (6日間) 培養し、T細胞の幼若化の程度をフローサイトメトリー (以下、「FACS」と称することもある) のFSC/SSC解析により調べた。

- その結果、SEBは0.01 ng/mL以上でPBMCに対し濃度依存的に強い増殖誘導活性を示した。代表例を図3に示す。N23YはSEBより増殖誘導
- 15 活性はかなり弱く、100 ng/mL以上でトリチウムチミジンの取り込みが検出されはじめ、1000 ng/mLでもSEBの1/10程度のカウントであった。エピトープ改変体は更に増殖誘導能が低下していた (図3)。また、幼若化誘導活性ではN23Yは1 ng/mL以上で10-30%の細胞に有意な幼若化を誘導したが、42-C2および47-C7の誘導活性はN23Yの約1/10程度であった。4-C1はN23Yとほぼ同等であった (図4)。これらの成
- 20

績から、エピトープ改変体はエピトープに変異を導入しても、インビトロでヒト PBMC に対する増殖誘導能や幼若化誘導能において、N23Y とほぼ同等の生物活性を有していることが明らかとなった。

#### (2) エピトープ改変体のサイトカイン誘導活性の評価

- 5 健康人の PBMC を  $1 \times 10^6 / \text{mL}$  で 24 ウェルプレートに播種し、SEB、N23Y、およびエピトープ改変体の 0.01、1、100、1000 ng/mL で 2 日間刺激後、上清を回収した。この培養上清の種々のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-1ra、IL-4、IL-10、GM-CSF) 産生を ELISA キット
- 10 (CytoSets、CytoFix、旭テクノグラス社) を用いて測定した。

- その結果、エピトープ改変体は N23Y と同様、SEB に比べサイトカイン産生能は低く、サイトカイン誘導パターンは N23Y と同様の傾向を示した。すなわち、抑制性サイトカイン IL-1ra、IL-10、IL-4 産生は相対的に有意に高く、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、GM-CSF、IFN- $\gamma$  の誘導は低かった。SEB 100 ng/mL 刺激時のサイトカイン誘導活性を 100% としたときのエピトープ改変体 (100 ng/mL) の相対活性を図 5 に示す。エピトープ改変体はインビトロでヒト PBMC に対するサイトカイン誘導能において N23Y と同等の生物学的活性を有していた。
- 15

- 20 また、図 5 に示す結果から明らかなように、SEB と比較して N23Y やエピトープ改変体では IFN- $\gamma$  の誘導が顕著に抑制され、それに対して抑制性サイトカイン IL-4、IL-10 の産生は相対的に高いことから、SEB 改変体は T 細胞ポピュレーションを Th1 から Th2 へシフトさせる活性を有していると考えられた。

#### 25 実施例 4

##### (1) エピトープ改変体のマウス関節炎モデルでの評価

マウスのコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) モデルで N23Y およびエピトープ改変体の薬効を評価した。7 週齢の DBA/1 J 雄マウスの尾根部にフロイントのコンプリートアジュバント (FCA) を用いて、ウシ II 型コラーゲンをマ

ウス当たり 100  $\mu$ g で感作した。3 週後に再度同抗原で追加感作して関節炎を誘導した。追加感作 1 週後に各マウスの四肢を観察し、関節炎の発症程度をスコア化した。スコア化は以下のように行った。各四肢について、未発症：0 点、指が 1 本腫脹：1 点、指が 2～4 本腫脹あるいは肢の甲が腫脹：2 点、全ての指が腫脹あるいは激しい腫脹：3 点。四肢の合計点数を算出し（最高 12 点）、当該マウスの関節炎スコアとした。関節炎のスコアが 1～4 点の軽度のマウスを選別して群を構成し、薬剤を経口投与した。薬剤は 10  $\mu$ g /マウスでゾンデを使って 4 週間連日投与した。薬剤投与開始から 1 週間に 2 度スコアを付け、関節炎の程度を観察した。投与終了後に四肢の関節をソフト X 線で撮影して、骨びらん

5 程度をスコア化して骨破壊に対する作用を評価した。

10

その結果、生理食塩水投与のコントロール群に比べて 4-C1 および 47-C7 の各エピトープ改変体は関節炎症状を有意に抑制した。42-C2 では抑制は認められなかった（図 6）。また、47-C7 および 4-C1 では骨破壊の抑制効果も観察された（図 7）。

## 15 (2) エピトープ改変体投与による抗 SEB 抗体の惹起

試験終了後に全採血し、血中の抗 SEB 抗体価を ELISA 法にて測定した。その結果、47-C7 投与群は薬剤無投与群、コントロールの生理食塩水投与群と同程度の値を示し、免疫原性が低減されていることが明らかとなった（図 8（A））。また、47-C7 改変体は、この蛋白自身に対する抗体誘導も低く、

20 エピトープを改変した配列が新たな抗原エピトープとなっている可能性は低いと思われた（図 8（B））。



## 請 求 の 範 囲

1. 黄色ブドウ球菌腸管内毒素B (SEB) に対する中和抗体 (抗SEB抗体) との反応性を低減させたSEB改変体。
2. SEBのアミノ酸配列に任意のアミノ酸置換を導入することにより抗SEB抗体との反応性を低減させた、請求項1に記載のSEB改変体。
3. SEBのアミノ酸配列中の抗SEB抗体エピトープ認識部位にアミノ酸置換を導入する、請求項2に記載のSEB改変体。
4. SEBのアミノ酸配列中の226位のLysから229位のLysまでの領域でアミノ酸置換を導入した、請求項2または3に記載のSEB改変体。
5. SEBのアミノ酸配列中の226位から229位までのアミノ酸配列がLeuPheAlaAlaである、請求項4に記載のSEB改変体。
6. SEBのアミノ酸配列中の226位から229位までのアミノ酸配列がAlaThrThrGlnである、請求項4に記載のSEB改変体。
7. SEBのアミノ酸配列中の226位から229位までのアミノ酸配列がLysArgIleIleである、請求項4に記載のSEB改変体。
8. SEBのアミノ酸配列中の23位のAsnがTyrで置換されている、請求項1から7のいずれかに記載のSEB改変体。
9. 請求項1から8のいずれかに記載のSEB改変体を主成分として含有し、SEBに対する免疫学的応答性を低下させ、T細胞活性化の抑制作用を有するものであることを特徴とする、免疫異常性疾患の予防・治療用剤。
10. 免疫異常性疾患が関節リウマチである、請求項9に記載の免疫異常性疾患の予防・治療用剤。
11. 経口投与剤である、請求項9または10に記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

1/8

図 1

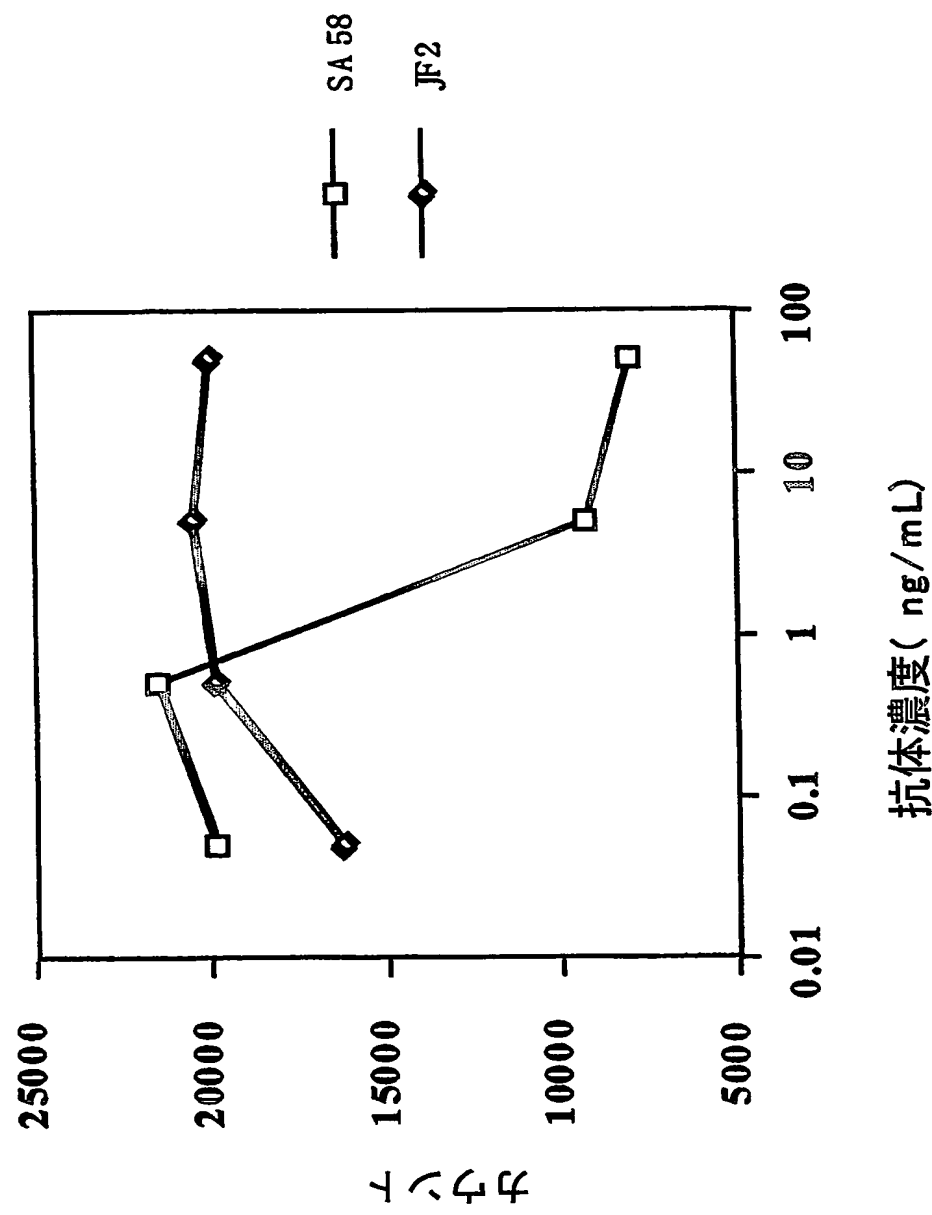
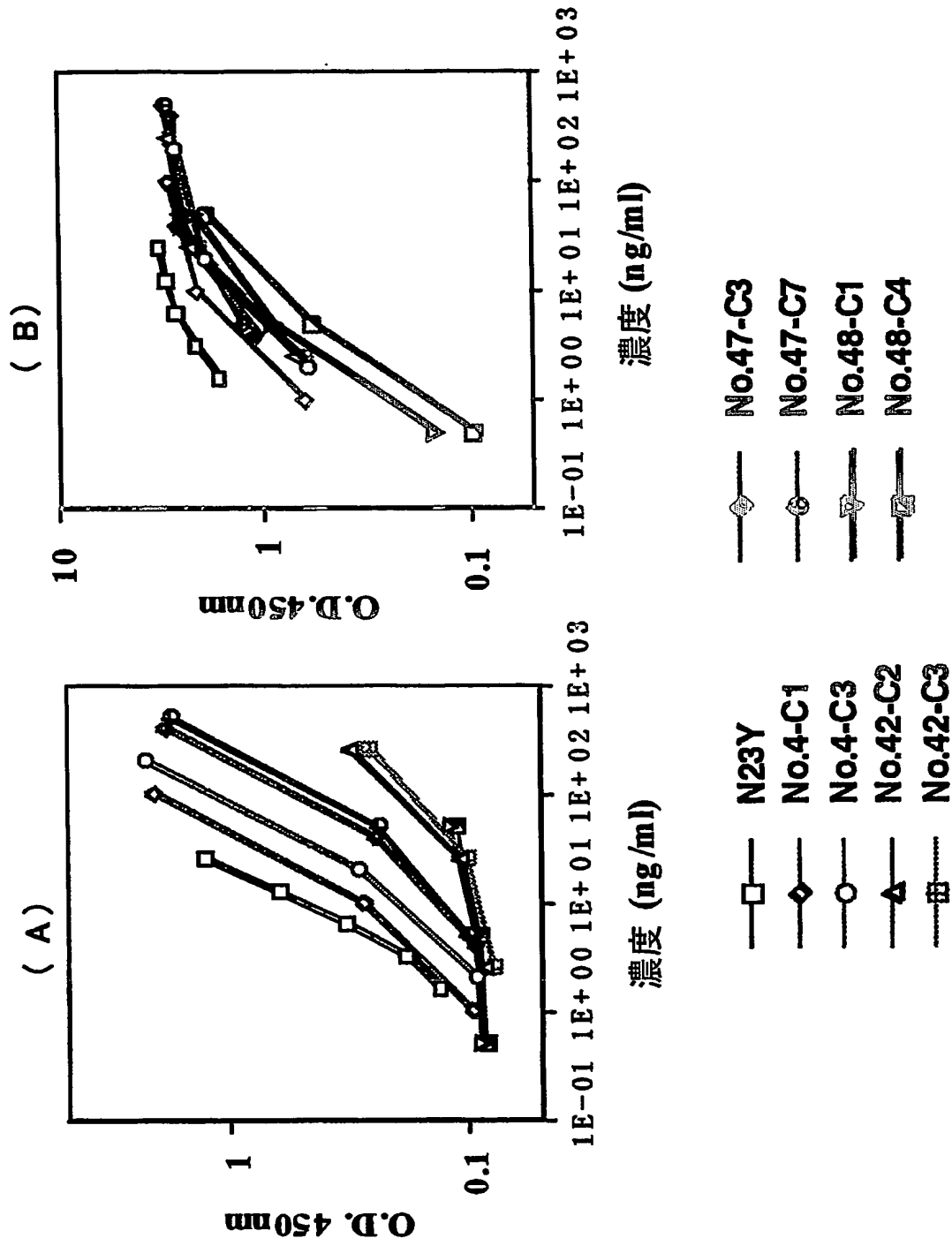
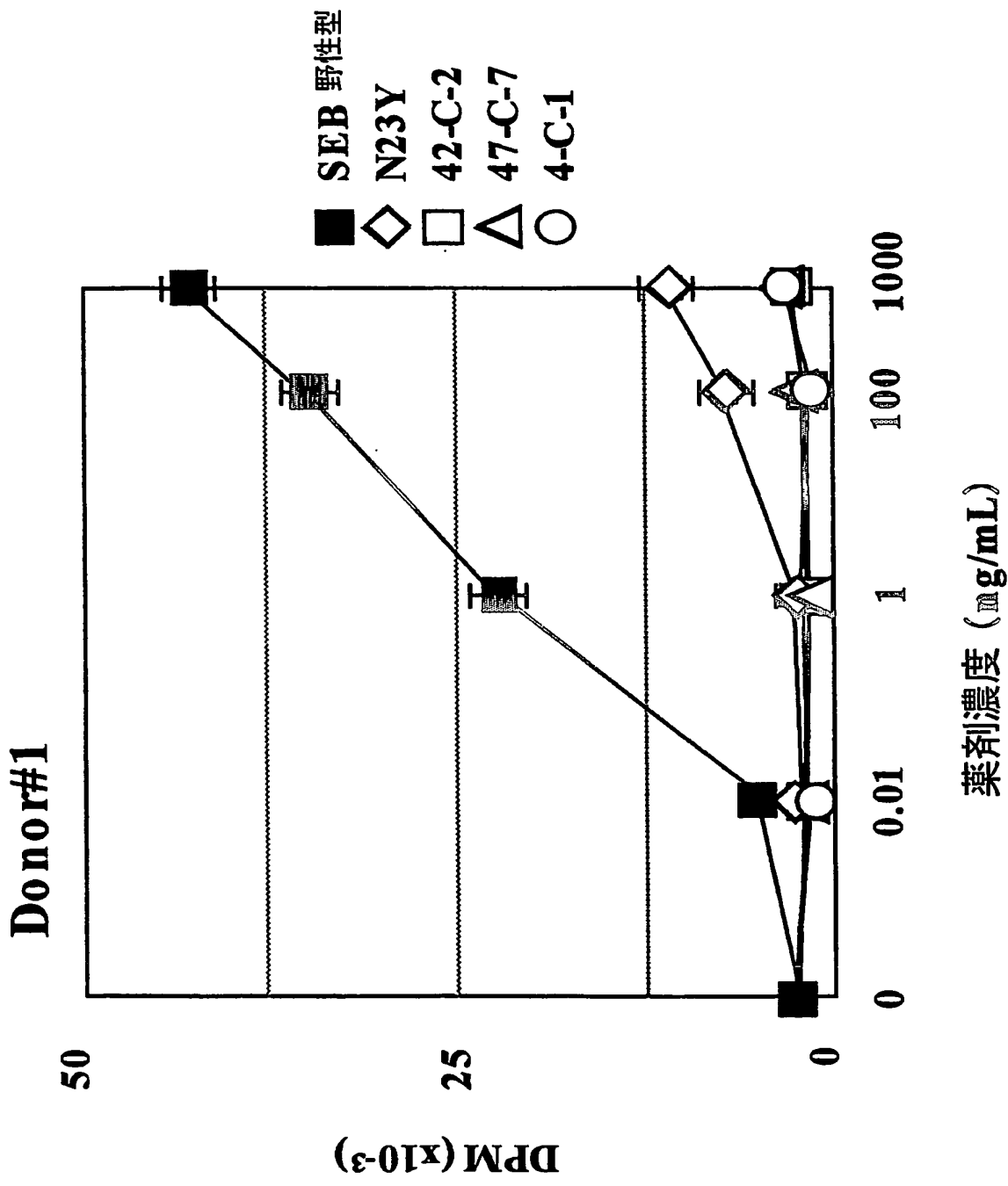


図 2



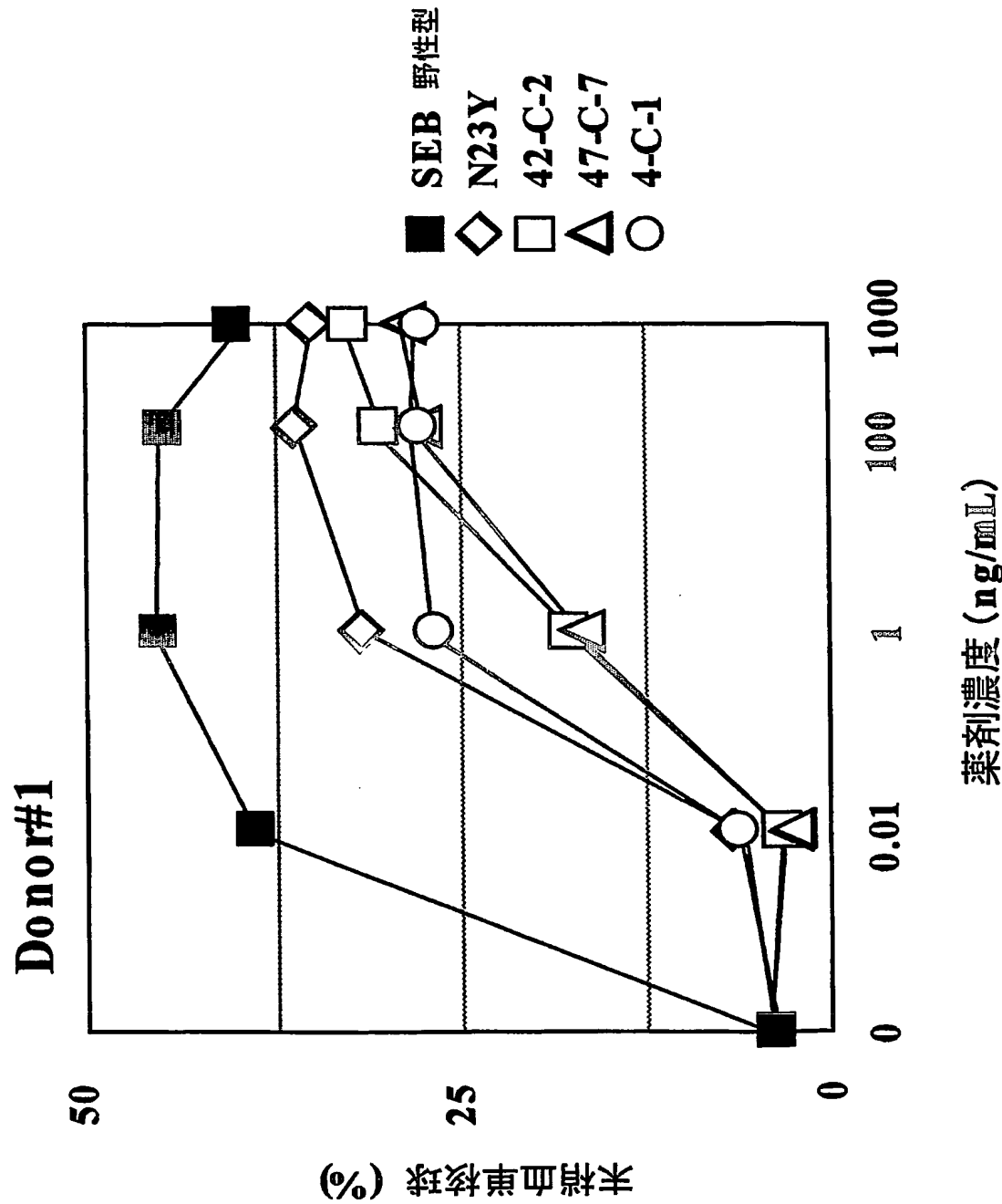
3/8

図 3



4/8

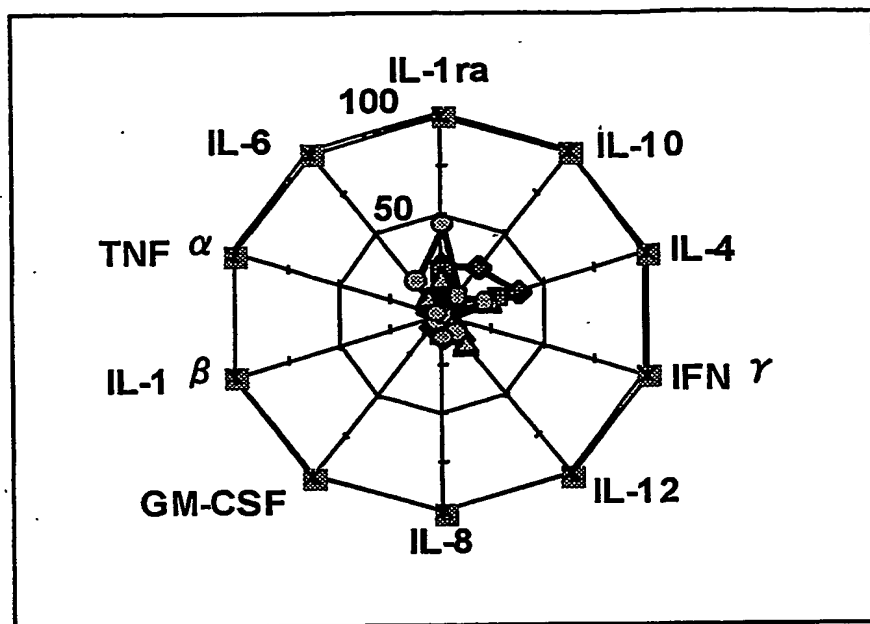
图 4



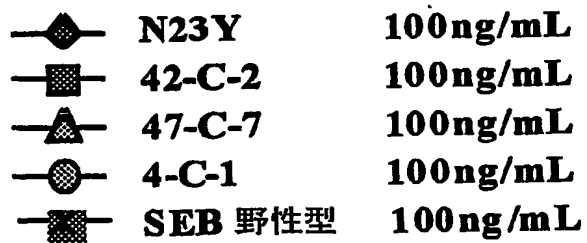
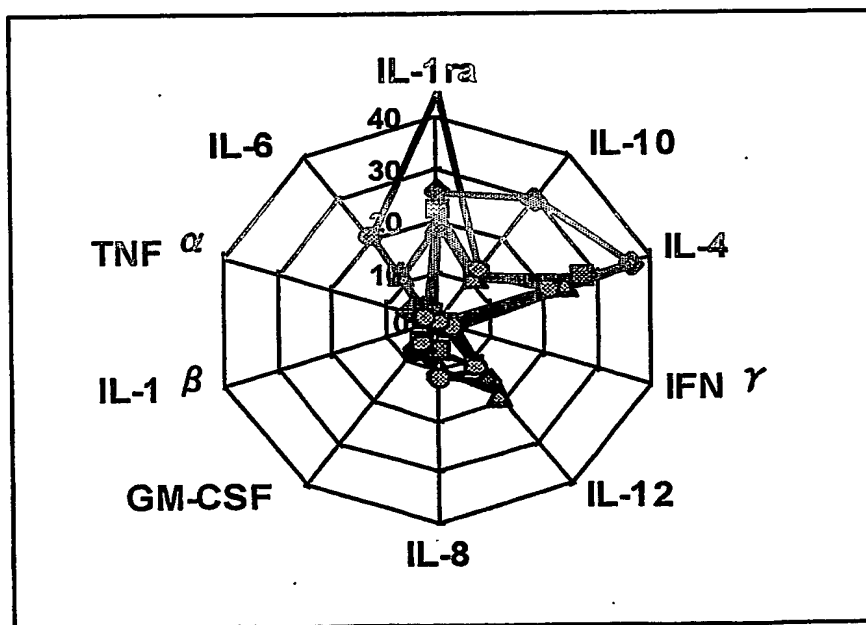
5/8

図 5

(A)



(B)



6/8

図 6

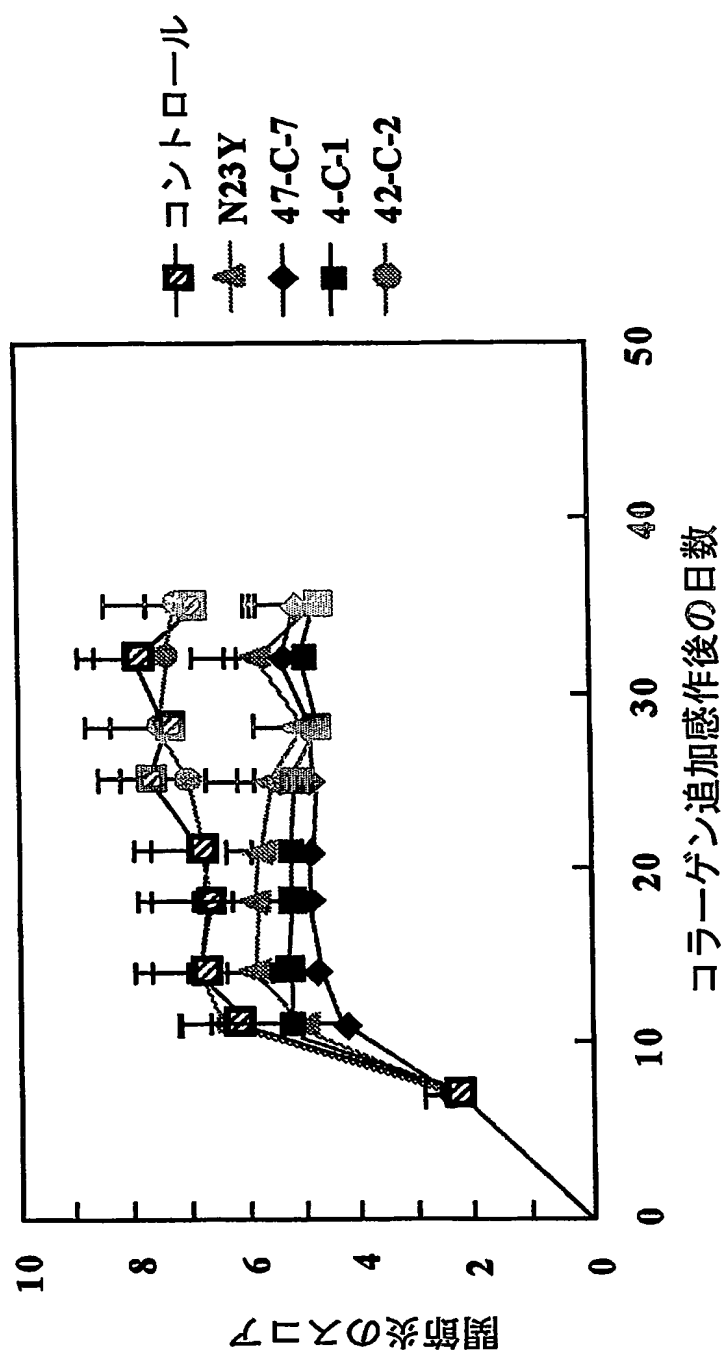
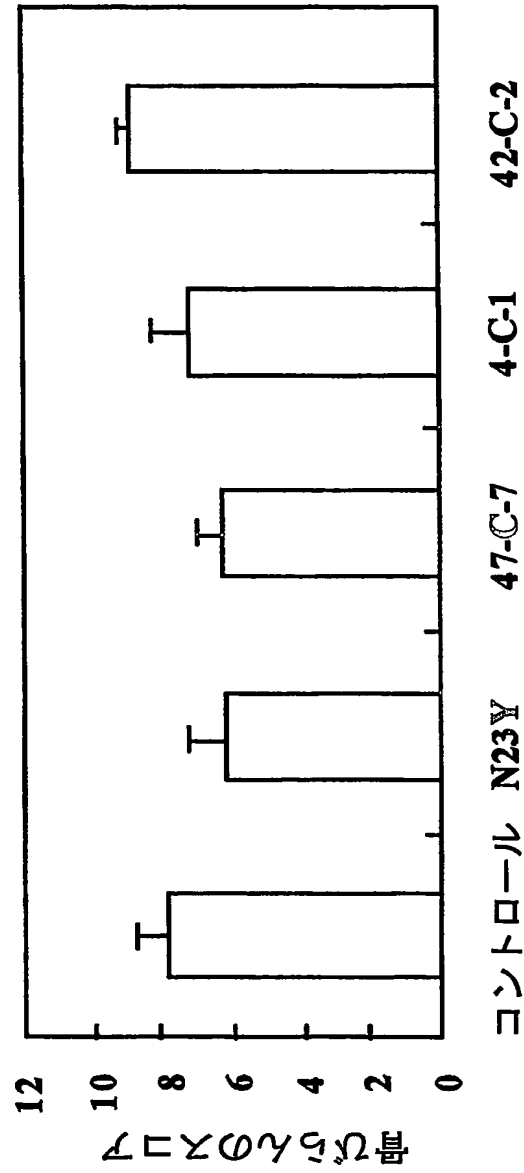


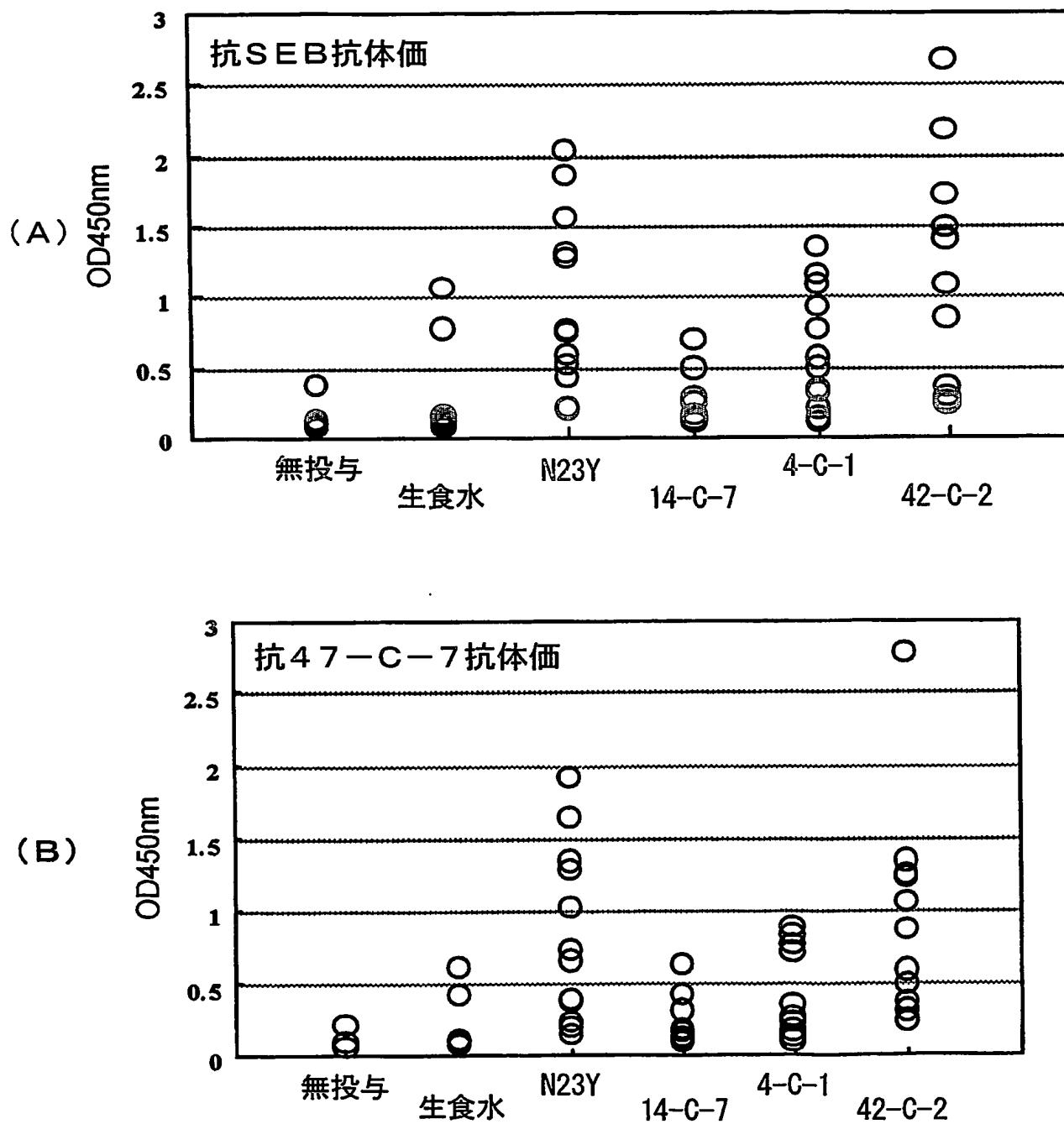
図 7





8/8

図 8



1/6

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

KOWA COMPANY, LTD.

&lt;120&gt; SEB VARIANT AND MEDICAMENT FOR PREVENTING AND TREATING

IMMUNOPATHIES CONTAINING THE SAME

&lt;130&gt; 664422

&lt;150&gt; JP 2003-91819

&lt;151&gt; 2003-03-28

&lt;160&gt; 9

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 1

Glu Ser Gln Pro Asp Pro Lys Pro Asp Glu Leu His Lys Ser Ser Lys

1 5 10 15

Phe Thr Gly Leu Met Glu Asn Met Lys Val Leu Tyr Asp Asp Asn His

20 25 30

Val Ser Ala Ile Asn Val Lys Ser Ile Asp Gln Phe Leu Tyr Phe Asp

35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ile Lys Asp Thr Lys Leu Gly Asn Tyr Asp Asn Val

50 55 60

Arg Val Glu Phe Lys Asn Lys Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Lys Asp Lys

65 70 75 80

2/6

Tyr Val Asp Val Phe Gly Ala Asn Tyr Tyr Tyr Gln Cys Tyr Phe Ser  
85 90 95  
Lys Lys Thr Asn Asp Ile Asn Ser His Gln Thr Asp Lys Arg Lys Thr  
100 105 110  
Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Glu His Asn Ala Asn Gln Leu Asp Lys  
115 120 125  
Tyr Arg Ser Ile Thr Val Arg Val Phe Glu Asp Gly Lys Asn Leu Leu  
130 135 140  
Ser Phe Asp Val Gln Thr Asn Lys Lys Lys Val Thr Ala Gln Glu Leu  
145 150 155 160  
Asp Tyr Leu Thr Arg His Tyr Leu Val Lys Asn Lys Lys Leu Tyr Glu  
165 170 175  
Phe Asn Asn Ser Pro Tyr Glu Thr Gly Tyr Ile Lys Phe Ile Glu Asn  
180 185 190  
Glu Asn Ser Phe Trp Tyr Asp Met Met Pro Ala Pro Gly Asp Lys Phe  
195 200 205  
Asp Gln Ser Lys Tyr Leu Met Met Tyr Asn Asp Asn Lys Met Val Asp  
210 215 220  
Ser Lys Asp Val Lys Ile Glu Val Tyr Leu Thr Thr Lys Lys Lys  
225 230 235

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

3/6

<223> Modified sequence at residues No. 226 to No. 229 in SEB

<400> 2

Leu Phe Ala Ala

1 4

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Modified sequence at residues No. 226 to No. 229 in SEB

<400> 3

Ala Thr Thr Gln

1 4

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Modified sequence at residues No. 226 to No. 229 in SEB

4/6

&lt;400&gt; 4

Lys Arg Ile Ile

1 4

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Epitope region of N23Y SEB variant

&lt;400&gt; 5

Ser Lys Asp Val Lys Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Epitope region of 42-C2 SEB variant including modified sequence at  
residues No. 226 to No. 229

&lt;400&gt; 6

5/6

Ser Leu Phe Ala Ala Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Epitope region of 42-C7 SEB variant including modified sequence at residues No. 226 to No. 229

&lt;400&gt; 7

Ser Ala Thr Thr Gln Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Epitope region of 4-C1 SEB variant including modified sequence at residues No. 226 to No. 229

&lt;400&gt; 8

6/6

Ser Lys Arg Ile Ile Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Epitope region of 48-C4 SEB variant including modified sequence at  
residues No. 226 to No. 229

&lt;400&gt; 9

Ser Pro Gln Pro Asp Ile Glu Val Tyr Leu

1 5 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004184

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/47, A61K38/17, A61P37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/47, A61K38/17, A61P37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),  
MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/40935 A1 (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 19 August, 1999 (19.08.99), & EP 1055429 A1 & AU 9923009 A	1-11
A	JP 9-110704 A (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 28 April, 1997 (28.04.97), (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 April, 2004 (27.04.04)

Date of mailing of the international search report  
18 May, 2004 (18.05.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09、C07K14/47、A61K38/17、A61P37/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09、C07K14/47、A61K38/17、A61P37/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt/PIR/Geneseq、  
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、JSTPlus (JOIS)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/40935 A1 (化学及血清療法研究所) 1999. 08. 19 & EP 1055429 A1 & AU 9923009 A	1-11
A	JP 9-110704 A (化学及血清療法研究所) 1997. 04. 28 (ファミリーなし)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
27. 04. 2004

国際調査報告の発送日 18. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
田村 明 照

4 N 8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448